DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20200108

基于iTRAQ技术的干旱胁迫下玉米 苗期蛋白质组学研究

姜志磊,金峰学,李毅丹

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室,长春 130033)

摘 要:采用同位素标记相对定量(iTRAQ)技术,对干旱胁迫条件下苗期玉米的蛋白质组学变化进行分析。结 果表明,共检测到玉米幼苗中的207个蛋白在干旱胁迫后发生了显著的丰度变化。根据蛋白注释情况可将这些蛋 白归入信号传导、渗透调节、蛋白合成与折叠、ROS清除、膜运输、转录相关、细胞结构与细胞周期、脂肪酸代谢、碳水 化合物与能量代谢、光合作用与光呼吸等代谢途径。干旱胁迫后,涉及光反应和呼气作用的差异蛋白多表现为丰度 上升;涉及碳水化合物及蛋白质合成差异蛋白多表现为丰度下降;与渗透调节相关的脱水蛋白、脯氨酸代谢和渗透 胁迫相关的蛋白酶则显示为丰度上升。干旱胁迫还能导致植物体内活性氧大量产生,活性氧清除相关的酶类也会 发生明显的丰度上升。根据研究结果推测,玉米苗期主要通过降低植株生长速率、减少水分散失、清除自由基等多 种方式维持其在干旱胁迫条件下的生长发育过程。

关键词: 玉米;iTRAQ;蛋白质组学;胁迫相关蛋白;蛋白功能中图分类号: S513.035.3文献标识码: A

iTRAQ-based Quantitative Proteomic Analysis of Maize Seedlings in Response to Drought Stress

JIANG Zhi-lei, JIN Feng-xue, LI Yi-dan

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/

Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China)

Abstract: To investigate the molecular mechanisms of drought tolerance response in maize seedlings, protein abundance changes were studied by using isotopic tagging relative quantitation (iTRAQ). A total of 207 proteins were detected to be significantly differently expressed during drought tolerance in maize seedlings. These differential proteins were divided into 10 categories including signaling, osmoregulation, protein synthesis and folding, ROS clearance, membrane transport, transcription related, cell structure and cell cycle, fatty acid metabolism, carbohydrate and energy metabolism, as well as photosynthesis and photorespiration. Most proteins involved in photoreaction and exhalation were accumulated; most of carbohydrate and protein synthesis related proteins were reduced; and proteins associated with the osmotic adjustments such as dehydrins, proline, and osmotic stress were accumulated. In addition, drought stress always induces excessive reactive oxygen species(ROS) in plants, and the significant accumulation of some ROS scavenging related enzymes was detected in this study. Comprehensive analysis of the results, maize seedlings might maintain the growth and development process under drought stress conditions by decreasing plant growth rate, reducing water loss and scavenging free radicals.

Key words: Maize; iTRAQ; Proteomics; Stress-related protein; Protein function

录用日期: 2018-11-08

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目"ZmGA2ox6基因的深入发掘及其多效性研究"(CXGC2018ZY025)、 吉林省科技发展计划国际科技合作项目"ZmGA2ox类赤霉素合成调控基因在玉米耐旱响应中的 研究及应用"(20160414041GH)

作者简介:姜志磊(1981-),硕士,助理研究员,从事生物技术研究。E-mail:jiang1891@aliyun.com 李毅丹为本文通讯作者。E-mail:liyidan@foxmail.com

玉米是我国重要的粮饲作物,我国70%以上的 玉米种植区经常遭受干旱影响,每年造成巨大的损 失。植物的耐旱响应多涉及功能基因、microRNAs 调控以及激素、离子、代谢物等多个层面^[1-5]。干旱 胁迫通常会造成玉米的种子萌发推迟、植株生长受 阻、花期缩短,影响营养物质向子粒转移而最终造成 减产^[6-9],但造成这些生理生化改变的机制机理仍未 得到深入的解析。因此,研究玉米抗旱分子机理,为 培育耐旱玉米新品种提供理论支持,成为亟待解决 的问题。

近年来,各类组学手段逐步被用于解析植物耐 旱分子机制,但对玉米干旱胁迫下的蛋白质组研究 仍非常有限。因此,本研究利用高通量iTRAQ定量 蛋白质组学技术对B73玉米苗期进行干旱胁迫后的 蛋白质组进行分析,从整体上了解玉米苗期干旱胁 迫下蛋白质组变化的总体规律,归纳出参与耐旱响 应的关键代谢通路,为阐释玉米响应干旱胁迫的分 子机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 玉米苗期干旱胁迫

本实验选择玉米自交系 B73 为供试材料。首 先,选取大小一致的种子在26℃暗培养条件下,于湿 润的脱脂棉上诱导发芽。发芽后,选择发芽情况基 本一致的种子移栽于装填了200g耕种层土壤(装盆 前充分烘干)的培养钵中。移栽后土壤含水量维持 在80g左右。在28℃/22℃(16h昼/8h夜)、光照强度 为250 µmol/(m²·s)、相对湿度60%的条件下,培养至 3叶1心期后,进行模拟干旱胁迫。其中,干旱胁迫 组停止供水,对照组继续保持正常培养条件。干旱 胁迫处理后第5天,干旱胁迫组土壤含水量降至低 于15g时进行取材。处理组和对照组均选择生长状 态基本一致的单株各20株,每5个单株取全部地上 材料混合作为1个待测样品,液氮保存。处理组和 对照组各4个生物学重复用于蛋白提取和后续分析。

1.2 蛋白组分析

样品由上海鹿明生物科技有限公司进行蛋白提取与含量测定、蛋白消化与标记、反相色谱分离、反向色谱-TripleTOF分析和数据分析。具体的操作步骤根据 Vélez-Bermúdez等¹¹⁰介绍的方法进行,并做了部分调整。所获得的数据采用含 Paragon algorithm 算法的 Protein Pilot Software v. 5.0(AB SCIEX, USA)软件进行处理。本实验使用的数据库为玉米数据库,数据库来源于 Uniprot。蛋白质鉴定主要是通过实验串联质谱数据与数据库模拟得到的理论质

谱数据进行匹配,从而得到蛋白质鉴定结果。搜索 参数设置如下:胰蛋白酶作为消化类型;肽段质量误 差为15 mol/L;串联质谱误差为0.1 Da。蛋白至少含 有1个唯一肽段,并且阳性结果错误率(FDR)≤1%才 被认为鉴定有效。

根据蛋白质谱搜库检索结果得到原始数据,根据Unused>1.3和unique peptide≥1原则,去除无效值和反库数据,筛选出可信蛋白。由于iTRAQ是相对定量的方法,为保证定量结果的准确性,在相关iTRAQ研究结果的基础上^[11-13],适当提高差异蛋白的检出标准。只有蛋白的定量信息至少存在于3次生物学重复中才做进一步分析。基于可信蛋白数据,以有效生物学重复的平均值作为最终蛋白表达倍数,根据倍数变化大于1.3或小于0.77,并且在统计学ANOVA检验上P<0.05为标准所筛选出的差异蛋白定义为表达丰度显著差异的蛋白。

本实验 GO 富集分析基于主流的数据库 David 6.7(http://david.abcc.ncifcrf.gov/) 和 Quick GO(http:// www.ebi.ac.uk/QuickGO/)对筛选的差异蛋白质进行 GO 分类注释和富集分析,并且按照生物过程、分子 功能及细胞组件的功能范畴进行分类^[14]。

1.3 qRT-PCR验证

使用 RNAiso 试剂盒(宝日医生物技术有限公司) 对各样品进行总 RNA 提取。获得的总 RNA 再各取 1 µg 使用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技 术有限公司)进行基因组 DNA 的去除和 cDNA 的合 成。合成的 cDNA 稀释 10 倍后用于 qRT-PCR 检测, 检测设备为 ABI 7900HT(赛默飞世尔科技)。qRT-PCR选择 SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒(宝日医 生物技术有限公司),每个样品需进行 3 次技术重 复。检测所获数据使用 2^{-AAG}法进行分析。选择玉 米 actin 基因作为内参基因,检测引物为 Fw:5'-CT-GAGGTTCTATTCCAGCCATCC 和 Rev: 5'-CCAC-CACTGAGGACAACATTACC,根据蛋白丰度差异选 择 17 个基因用于 qRT-PCR 验证,基因及检测引物 等相关信息详见表 1。

2 结果与分析

2.1 原始数据分析及差异蛋白筛选

通过iTRAQ分析,根据蛋白质谱检索结果共得 到4504个蛋白,筛选出可信蛋白3676个。与对照 组相比,处理组中2533个蛋白丰度增加,平均增加 1.115倍;1758个蛋白丰度下降,平均下降0.911 倍。根据倍数变化大于1.3或小于0.77即认定为差 异表达蛋白的原则,共鉴定出差异蛋白207个,这些 差异蛋白中有38个蛋白只在3次生物学重复中被检 出,而其他蛋白均在4次生物学重复中被检出,4次 生物学重复的一致性达到83.34%。检出的差异蛋 白中111个蛋白丰度增加,平均增加1.493倍;96个 蛋白表达下降,平均下降0.699倍。在全部检出的差 异蛋白中,玉米脱水蛋白DHN1(A3KLI1)在干旱胁迫 后蛋白丰度增加倍数最高,为对照组的4.308倍;涉 及光合系统I组分形成的翻译起始因子TAB2 (B4FTR7)在干旱胁迫后蛋白丰度下降最多,仅为对 照组的0.449倍。

表1 qRT-PCR验证所选基因及对应引物信息

Table 1 List of the expression profiles selected for confirmation by qRT-PCR

登录号 Accession No.		qRT-PCR引物	蛋白质种类名称
UniProt	B73 RefGen_v4	qKT–PCK primer	Protein species name
B4FKG5	Zm00001d023529	F: ACCACCTGTTCCACCACAAG R: CTCCTCCTCGATCTTGTGGC	Abscisic acid stress ripening protein 2
K7U051	Zm00001d050493	F: GACTTCTCCCGCCTCTACCT R: CGGTTGAGGAAGTCGCTGAT	Gibberellin receptor GID1L2
A3KLI1	Zm00001d037894	F: CGCGTCAAAGCCGTAATGTT R: TGAACAGTACACGGACCCAG	Dehydrin DHN1
B6T2K5	Zm00001d004052	F: TTCATATCCTCACTCGCCGC R: CGCTTCTTTTCCCTCTCGGT	60S ribosomal protein L35
C4J410	Zm00001d012420	F: tcaagaagaaggtggacgcc R: gttgcagatcccctcaaget	Heat shock protein1
Q9FQA3	Zm00001d020780	F: categacgaggtetggaagg R: cegaaccaggcetteatcag	Glutathione transferase GST
A5H453	Zm00001d022456	F: gacatggtegeteteteagg R: egaggtteeceatetteace	Peroxidase 42
P23346	Zm00001d047479	F: ccagaagatgagaaccgcca R: gcccaccctttccaagatca	Superoxide dismutase [Cu–Zn] 4AP
A0A1D6HZB6	Zm00001d019627	F: ggctactagtgcactggacg R: aagcaagtetetgtgteceg	ABC transporter B family member 28(ATP- Binding Cassette)
B8A390	Zm00001d046591	F: ggtgtgcagaagacggtgta R: ccttcccaatggcagcagta	Vacuolar–type H^* –pyrophosphatase 5
K7TI82	Zm00001d024703	F: acggcgacaagggtaagaag R: tgtccacgaccttcttcacg	C3H transcription factor
Q41785	Zm00001d040508	F: ttgtgatateceteegegtg R: egtecteatatteegeetee	Tubulin beta–8 chain O
A0A1D6HJU1	Zm00001d017989	F: cagcgtggtgtcctacttca R: gctgcttgaagttgatgggc	GDSL esterase/lipase
B4F8L7	Zm00001d027488	F: aacaccgtgaagactggcat R: tcgtacaccttgcactcgtc	Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydroge- nase
C0PGB5	Zm00001d043986	F: etceaaccegageagaagtt R: etttgaaegagegeaacete	Pyruvate kinase
B6TH55	Zm00001d005446	F: aggcgccaaggtgaagatc R: ctcgtccaaggcgtagttgt	Photosystem I reaction center subunit IV A
B4FTR7	Zm00001d017179	F: actggagaggaggtacgcat R: ccgtcggagttgaggttctc	Tab2 protein

2.2 GO功能注释及KEGG分析

差异蛋白经 GO 注释后,按照生物过程(Biological Process)、分子功能(Molecular Function)及细胞组 件(Cell Component)的功能范畴进行分类。由图 1所 示,玉米幼苗干旱胁迫后产生的差异蛋白涉及多种 生物过程与分子功能。按照生物过程的 GO 富集统 计分析显示,差异蛋白显著富集的生物过程共有 20 类,主要涉及光合及光呼吸、能量代谢和碳固定等方 面,而与植物非生物胁迫响应相关的蛋白稳定、氧化 还原和水分响应等生物过程也有差异蛋白的显著富 集。其中,差异蛋白富集显著性最强的为光合作用 过程(photosynthesis, GO: 0015979, P=3.49E-06);富 集差异蛋白数量最多的为氧化还原过程(oxidationreduction process, GO: 0055114, P=8.93E-03),共有 19 个差异蛋白富集。在水分响应生物过程(response to water, GO:0009415)中,所涉及的蛋白均为 脱水蛋白,且均表现为干旱胁迫下蛋白丰度显著增加,其中,丰度增加倍数最高的为脱水蛋白DHN1。

按照分子功能的 GO 富集统计分析显示,显著 富集的差异蛋白功能涉及21类,其中,3个核酮糖二 磷酸羧化酶活性相关功能的蛋白变化最为显著,主 要功能涉及 CO₂固定相关过程;而差异蛋白富集数 量最多的为具有氧化还原酶活性的蛋白,共有 19 个。这与生物过程的 GO 富集统计分析结果较为一 致,说明干旱胁迫诱导发生表达变化的蛋白与光合 作用、碳固定和非生物胁迫响应密切相关。

按照细胞组件的 GO 富集统计分析显示,干旱 胁迫下表现出显著富集的差异蛋白涉及的细胞组件 共53类,但这些类别的划分存在冗余。综合分析, 干旱诱导的差异表达蛋白大多数定位于叶绿体、线 粒体或其他相关的膜结构中。这也与光合作用和碳 固定等过程中重要蛋白所处位置相一致。



Fig.1 Gene Ontology(GO) annotation of the differential abundance protein species(DAPS) under the drought stress

以上3种GO分析结果显示,在干旱胁迫后玉米 幼苗受到影响最大的是光合作用,而幼苗对干旱胁 迫的应答则主要显现在氧化还原相关蛋白的表达变 化。差异蛋白KEGG富集分析结果显示,只有光合 作用通路(zma00195, P=4.06E-08)的变化达极显著 水平,富集了8个差异蛋白。这再次说明在干旱胁 迫下玉米幼苗的光合过程是受影响最大的代谢 通路。

由于GO和KEGG分析的结果易出现重复统计和概念交叠等问题。因此,对207个差异蛋白中有详细功能注释的142个蛋白进行了更为细致的归类分析,将差异蛋白分为10类,涉及信号传导(7个)、渗

透调节(5个)、蛋白合成与折叠(31个)、ROS清除(14个)、膜运输(19个)、转录相关(19个)、细胞结构与细胞周期(9个)、脂肪酸代谢(3个)、碳水化合物与能量代谢(15个)和光合作用与光呼吸(20个)。

2.3 qRT-PCR验证

为了阐明mRNA转录水平与蛋白质表达丰度之间的对应关系,利用qRT-PCR方法对17个基因进行了转录分析。图2结果显示,干旱胁迫后15个基因的表达水平与相应蛋白质的丰度变化呈现相同的趋势,如Gibberellin receptor GID1、Dehydrin DHN1和Superoxide dismutase等。相比之下,60S ribosomal protein和ABC transporter B family member 28 这 2 个基因的表达水平显示出与其相应蛋白质的丰度变化相反的趋势。这种差异可能是由于在干旱胁迫后

的各种转录后调控和翻译后修饰造成的。



图 2 干旱胁迫下部分差异蛋白的 qRT-PCR 验证 Fig.2 Analysis of transcript levels of the differential abundance protein species between drought stress and control conditions by qRT-PCR

3 结论与讨论

干旱胁迫可以诱发植物各个组织器官发生形态、生理和生化方面的改变。已报道的大量与植物耐旱相关的候选基因多涉及各种信号传导途径、激素的生物合成途径、渗透保护代谢途径和活性氧清除途径^[15,16]。由于转录后调控和翻译后修饰等过程的存在,基因表达变化与蛋白丰度变化之间还存在着复杂的调控过程。随着高通量蛋白质组学技术的不断完善和发展,蛋白质组分析的通量和精度得到了全面的提高,已成为研究植物耐旱机制的又一有力工具^[17,18]。利用蛋白质组学分析方法已获得大量与植物耐旱相关的蛋白,主要涉及信号传导、转录、胁迫与防御、蛋白质合成、折叠与降解、光合作用与光呼吸、碳水化合物与能量代谢、膜与运输、细胞结构与细胞周期、氮同化与氨基酸代谢以及脂肪酸代谢等多个方面^[19-23]。

本研究发现的涉及信号传导的差异蛋白包括与 脱落酸、乙烯和赤霉素等激素信号传导相关的蛋白 ASR(A0A1D6EB22, B4FKG5)和 GID1(K7U051)等。 脱落酸与乙烯相关基因多为与植物响应生物胁迫的 指示性基因,在植物受到干旱、冷、盐和弱光胁迫后 均会发生迅速的表达上调^[22-24]。本研究发现,ASR2 和ASR3在干旱胁迫后发生了明显的丰度增加,说 明在玉米干旱响应过程中该类基因是脱落酸信号传 导过程中较为重要的响应元件。另外,在干旱胁迫 后赤霉素信号传导途径中的GID1蛋白丰度明显下 降。GID1在植物体内通过与赤霉素结合,可以诱使 抑制植物生长的DELLA蛋白降解,从而发挥赤霉素 的生物学功能^[25-28]。GID1的丰度下降则减少了对 DELLA的抑制,使植物的生长减缓,从而在短期内 对水分的需求降低。这可能是植物应对干旱的一个 应激反应途径。CBL作为另一类与脱落酸信号传导 相关的蛋白^[29-31],在本研究中也被发现在干旱胁迫 后蛋白丰度发生了明显的增加。上述结果说明,在 玉米中干旱胁迫后所涉及的信号传导途径的变化多 与激素类的信号传导途径相关。

与渗透调控相关的玉米脱水蛋白(dehydrin, DHN)是一种植物中广泛存在的亲水性蛋白,DHN 基因能在植物胚胎发育后期及处于干旱、低温、盐碱 等非生物逆境的组织中大量表达,具有稳定细胞膜、 清除自由基、结合金属离子以及分子伴侣等重要的 功能^[31-33]。赵阳等^[34]从玉米 B73全基因组中共鉴定 出了5个玉米DHN基因,其中,ZmDHN1、ZmDHN 3、 ZmDHN 4和 ZmDHN5 对盐和干旱胁迫的处理均表 现出显著的上调表达。本研究中玉米脱水蛋白的丰 度增加,与上述研究中脱水蛋白在逆境胁迫中的反 应一致,说明在玉米干旱胁迫后 DHN类蛋白可能发 挥了主要的调节作用。

本研究发现,涉及蛋白合成与折叠过程的差异 蛋白数量达到31个。因此可以推断蛋白质的合成 和折叠是玉米苗期应对于旱胁迫的一个重要代谢过 程。这些差异蛋白主要包括各类核糖体蛋白(Ribosomal protein)、翻译起始因子(Translation initiation factor)和肽链释放因子(Peptide chain release factor) 等,而且这些蛋白的丰度在干旱胁迫后都出现了下 降。与之相反,与蛋白折叠相关的热激蛋白(Heat shock protein)和分子伴侣(Chaperone)类蛋白的丰度 则整体上出现了增加。与蛋白合成相关的蛋白丰度 下降,说明苗期玉米在干旱胁迫下整体的蛋白合成 水平下降,其生长速度将明显降低,进而减少水分消 耗以度过干旱阶段。这与信号传导类蛋白的变化所 导致的生长减缓相一致,这一现象也曾在菜豆 (Phaseolus vulgaris)的研究中被发现^[37]。与蛋白折叠 相关的蛋白丰度增加,说明在植物遭受干旱胁迫后, 维持蛋白质构象稳定以及对已损伤的蛋白进行修复 是植物耐旱的重要过程[38~40]。

在植物正常代谢受到外界干扰(如干旱等非生 物胁迫)后,会产生过量的ROS(Reactive oxygen species),不利于其生长。此时,ROS的清除过程就成为 植物耐受非生物胁迫的重要环节。在本研究中发现 了一系列涉及ROS清除的蛋白在干旱胁迫后丰度 明显增加。根据ROS的清除机制不同,可将这些差 异蛋白分为两类,一类是抗氧化酶类:主要包括超氧 化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢 酶(Peroxidase, POD)等;另一类是化学抗氧化物代谢 相关蛋白,主要包括抗坏血酸代谢相关的脱氢抗坏 血酸还原酶(Dehydro ascorbate reductase, DHAR)和 谷胱甘肽代谢相关的谷胱甘肽转移酶类(Glutathione S-transferase, GST)等。在拟南芥、水稻、小麦、油 菜等植物中,已有大量研究证明POD、SOD、DHAR、 GST等蛋白参与了耐旱响应[41-46]。本研究结果证实 了玉米耐旱响应过程中也同时存在着多种ROS清 除机制。

综合以上分析,玉米叶片对干旱胁迫的响应涉 及了诸多过程,包括光合作用相关蛋白丰度增加、碳 水化合物及蛋白质合成相关蛋白丰度下降以及与渗 透调节相关的脱水蛋白、脯氨酸和渗透胁迫相关蛋 白丰度增加。另外,干旱胁迫还能导致植物体内活 性氧大量产生,活性氧清除相关的酶也会发生明显 丰度增加。在此基础上,后续研究中对胁迫后不同 时间点的候选基因、代谢途径乃至整个蛋白组进行 综合的分析,将有助于精准解析玉米耐受干旱胁迫 的响应机制。

参考文献:

- Budak H, Hussain B, Khan Z, et al. From Genetics to functional genomics: improvement in drought signaling and tolerance in wheat[J]. Frontiers in Plant Science, 2015(6): 1012.
- [2] 张仁和,薛吉全,浦 军,等. 干旱胁迫对玉米苗期植株生长和光 合特性的影响[J]. 作物学报,2011,37(3):521-528.
 Zhang R H, Xue J Q, Pu J, et al. Effects of drought stress on plant growth and photosynthetic characteristics at seedling stage[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(3): 521-528. (in Chinese)
- [3] 于文颖,纪瑞鹏,冯 锐,等.不同生育期玉米叶片光合特性及水 分利用效率对水分胁迫的响应[J].生态学报,2015,35(9):2902-2909.

Yu W Y, Ji R P, Feng R, et al. Response of water stress on photosynthetic characteristics and water use efficiency of maize leaves in different growth stage[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2902– 2909. (in Chinese)

- [4] 常敬礼,杨德光,谭巍巍,等.水分胁迫对玉米叶片光合作用的影响[J].东北农业大学学报,2008,39(11):1-5.
 Chang J L, Yang D G, Tan W W, et al. Effects of water stress on photosynthesis of maize leaves[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(11): 1-5. (in Chinese)
- [5] 田 琳,谢晓金,包云轩,等.不同生育期水分胁迫对夏玉米叶片 光合生理特性的影响[J].中国农业气象,2013,34(6):655-660. Tian L, Xie X J, Bao Y X, et al. Effects of water stress on photosynthetic physiological characteristics of summer maize leaves at different growth stages[J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2013, 34 (6): 655-660. (in Chinese)
- [6] 成 锴,苏晓慧,栗建枝,等.PEG-6000胁迫下玉米品种萌发期 抗旱性鉴定与评价[J].玉米科学,2017,25(5):85-90.
 Cheng K, Su X H, Li J Z, et al. Identification and evaluation of maize drought resistance under PEG-6000 stress at germination stage[J]. Journal of Maize Sciences, 2017, 25(5): 85-90. (in Chinese)
- [7] 徐世昌,戴俊英,沈秀瑛,等.水分胁迫对玉米光合性能及产量的 影响[J].作物学报,1995,21(3):356-363.
 Xu S C, Dai J Y, Shen X Y, et al. Effects of water stress on photosynthetic properties and yield of maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 1995, 21(3): 356-363. (in Chinese)
- [8] 白莉萍,隋方功,孙朝晖,等.土壤水分胁迫对玉米形态发育及产量的影响[J].生态学报,2004,24(7):1556-1560.
 Bai L P, Sui F G, Sun C H, et al. Effects of soil water stress on morphological development and yield of maize[J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(7): 1556-1560. (in Chinese)
- [9] 纪瑞鹏,车宇胜,朱永宁,等.干旱对东北春玉米生长发育和产量的影响[J].应用生态学报,2012,23(11):3021-3026.
 Ji R P, Che Y S, Zhu Y N, et al. Impacts of drought stress on the growth and development and grain yield of spring maize in Northeast China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(11):

3021-3026. (in Chinese)

- [10] Velez-Bermudez I C, Wen T N, Lan P, et al. Isobaric tag for relative and absolute quantitation(iTRAQ)-Based protein profiling in plants[M]. In: Lois L., Matthiesen R.(eds) Plant Proteostasis. Methods in Molecular Biology, New York, Humana press, 2016.
- [11] Wang X, Shan X, Wu Y, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals new metabolic pathways responding to chilling stress in maize seedlings[J]. Journal of Proteomics, 2016, 146: 14.
- [12] Wang Z, Xu X, Gong Q, et al. Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants[J]. Journal of Proteomics, 2014, 98(4): 189– 205.
- [13] Wei J, Cong R, Li S, et al. Comparative proteomic analysis of soybean leaves and roots by iTRAQ provides insights into response mechanisms to Short-Term salt stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(35): 573.
- [14] Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21: 3674–3676.
- [15] Zhang Q. Strategies for developing green super rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(42): 16402–16409.
- [16] Krannich C T, Maletzki L, Kurowsky C, et al. Network candidate genes in breeding for drought tolerant crops[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(7): 116378–16400.
- [17] Baerenfaller K, Massonnet C, Walsh S, et al. Systems-based analysis of Arabidopsis leaf growth reveals adaptation to water deficit[J]. Molecular Systems Biology, 2012, 8(1): 606.
- [18] Mohammadi P P, Moieni A, Hiraga S, et al. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75: 1906–1923.
- [19] Benesova M, Hola D, Fischer L, et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration[J]. PLoS One, 2012, 7: e38017.
- [20] Bonhomme L, Valot B, Tardieu F, et al. Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves[J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2012, 11: 957–972.
- [21] Hu X L, Wu L J, Zhao F Y, et al. Phosphoproteomic analysis of the response of maize leaves to drought, heat and their combination stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 298.
- [22] Ke Y Q, Han G Q, He H Q, et al. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 379: 133–138.
- [23] Rabello F R, Villeth G R, Rabello A R, et al. Proteomic analysis of upland rice(*Oryza sativa* L.) exposed to intermittent water deficit[J]. The Protein Journal, 2014, 33: 221–230.
- [24] Cakir B, Agasse A, Gaillard C, et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling[J]. Plant Cell, 2003, 15: 2165– 2180.
- [25] Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, et al. Over-expression of the water

and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance[J]. Plant Cell and Environment, 2004, 27: 1459–1468.

- [26] Sang G K, Bae H H, Jung H J, et al. Physiological and protein profiling response to drought stress in KS141, a Korean maize inbred line[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2014, 17: 273– 280.
- [27] Colebrook E H, Thomas S G, Phillips A L, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J]. Journal of Experimental Biology, 2014, 217: 67–75.
- [28] Hedden P, Thomas S G. Gibberellin biosynthesis and its regulation [J]. Biochemical Journal, 2012, 444: 11–25.
- [29] Sun T P. Gibberellin-GID1-DELLA: A pivotal regulatory module for plant growth and development[J]. Plant Physiology, 2010, 154: 567-570.
- [30] Van De Velde K, Ruelens P, Geuten K, et al. Exploiting DELLA signaling in cereals[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(10): 880.
- [31] Kudla J, Batistic O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing[J]. Plant Cell, 2010, 22: 541– 563.
- [32] Zhang F, Li L, Jiao Z Z, et al. Characterization of the calcineurin B– Like(*CBL*) gene family in maize and functional analysis of ZmCBL9 under abscisic acid and abiotic stress treatments[J]. Plant Science, 2016, 253: 118–129.
- [33] 翟大勇,沈黎明. 脱水蛋白研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,1998,25(2):119-122.
 Zhai D Y, Shen L M. Research progress of dehydrated proteins[J].

Progress in Biochemistry and Biophysics, 1998, 25(2): 119–122. (in Chinese)

[34] 邢 鑫,刘 洋,李德全.植物脱水素的结构和功能[J].植物生 理学通讯,2010(3):268-276.

Xing X, Liu Y, Li D Q. Structure and function of plant dehydrins [J]. Plant Physiology Communications, 2010(3): 268–276. (in Chinese)

- [35] Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, et al. The plant dehydrins: structure and putative functions[J]. Biochemistry(Moscow), 2003, 68(9): 945-951.
- [36] 赵 阳,王 玉,蔡慧林,等.玉米脱水素基因家族的鉴定与分析[J]. 安徽农业大学学报,2015,42(5):657-665.
 Zhao Y, Wang Y, Cai H L, et al. Identification and characterization of the dehydrin gene family in maize[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2015, 42(5): 657-665. (in Chinese)
- [37] Zadraznik T, Hollung K, Egge–Jacobsen W, et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Journal of Proteomics, 2013, 78: 254– 272.
- [38] Sabehat A, Lurie S, Weiss D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries[J]. Plant Physiology, 1998, 117: 651-658.
- [39] Swindell W R, Huebner M, Weber A P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways[J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 125.
- [40] Timperio A M, Egidi M G, Zolla L . Proteomics applied on plant

abiotic stresses: role of heat shock proteins(HSP)[J]. Journal of Proteomics, 2008, 71: 391-411.

- [41] Kang G Z, Li G Z, Liu G Q, et al. Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate- glutathione cycle[J]. Biologia Plantarum, 2013, 57: 718-724.
- [42] Kim Y S, Kim I S, Bae M J, et al. Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice(*Oryza sativa* L. *japonica*)[J]. Planta, 2013, 237(6): 1613–1625.
- [43] Koh J, Chen G, Yoo M J, et al. Comparative proteomic analysis of Brassica napus in response to drought stress[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14: 3068–3081.
- [44] Mishra K K, Vikram P, Yadaw R B, et al. qDTY12.1: a locus with a consistent effect on grain yield under drought in rice[J]. BMC Ge-

netics, 2013, 14: 12.

- [45] Osipova S V, Permyakov A V, Permyakova M D, et al. Leaf dehydroascorbate reductase and catalase activity is associated with soil drought tolerance in bread wheat[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33: 2169–2177.
- [46] Xu J, Xing X J, Tian Y S, et al. Transgenic Arabidopsis plants expressing tomato Glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress[J]. Plos One, 2015, 10: e0136960.
- [47] Wang X L, Wang H W, Liu S X, et al. Genetic variation in ZmVPP1 contributes to drought tolerance in maize seedlings[J]. Nature Genetics, 2016, 48(10): 1233-1241.
- [48] Ford K L, Cassin A, Bacic A. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2011, 2: 44.

(责任编辑:朴红梅)

(上接第50页)

Cao Y, Zhang X Z, Chen X J, et al. Cioning and functional analysis of *GmNF*-*YC2* gene in soybean(*Glycine max*)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(9): 1607-1616. (in Chinese)

- [4] Wang Y, Zhang W Z, et al. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2008, Vol. 148, pp: 1201–1211.
- [5] Libault M, Wan J, Czechowski T, et al. Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin–ligase genes responding to chitin, a plant–defense elicitor[J]. Molecular Plant–Microbe Interactions: MPMI, 2007, 20(8): 900.
- [6] Pendle A F, Clark G P, Boon R, et al. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions[J]. Molecular Biology of the Cell, 2005, 16(1): 260–269.
- [7] Xu L, Liu Z Y, Zhang K, et al. Characterization of the pinus massoniana transcriptional response to bursaphelenchus xylophilus infection using suppression subtractive hybridization[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(6) :11356–11375.

- [8] Kumimoto R W, Zhang Y, Siefers N, et al. NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 63(3): 379–391.
- [9] Hackenberg D, Keetman U, Grimm B. Homologous NF-YC2 subunit from arabidopsis and tobacco is activated by photooxidative stress and induces flowering[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(3): 3458–3477.
- [10] Sato H, Mizoi J, Tanaka H, et al. Arabidopsis DPB3-1, a DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits[J]. Plant Cell, 2014(26): 4954-4973.
- [11] Chen H, Lan H, Huang P, et al. Characterization of OsPM19L1 encoding an AWPM-19-like family protein that is dramatically induced by osmotic stress in rice[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(4): 11994-12005.

(责任编辑:朴红梅)